

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Labu kuning dipercaya memiliki banyak manfaat bagi tubuh karena kandungan gizi yang cukup banyak. Namun pemanfaatan labu kuning kurang maksimal dan banyak dibiarkan busuk. Sehingga perlu inovasi agar memiliki daya simpan yang lebih lama dan pemanfaatannya dapat dimaksimalkan oleh masyarakat, salah satunya dengan cara dibuat menjadi tepung labu kuning. Dalam penelitian ini telah dilakukan analisis pengaruh fermentasi terhadap nilai gizi tepung labu kuning (*Cucurbita moschata*) meliputi kadar protein, karbohidrat, dan serat kasar. Fermentasi dengan menggunakan BAL dapat mempengaruhi nilai gizi dari pangan yang dihasilkan. Dalam penelitian ini digunakan bakteri *Lactobacillus casei* yang bertujuan untuk meningkatkan kadar protein, menurunkan kadar karbohidrat dan serat kasar. Penentuan kadar protein dilakukan dengan metode Kjeldahl, penentuan kadar karbohidrat dengan metode Somogyi-Nelson, dan penentuan kadar serat kasar diuji dengan metode penambahan bahan kimia asam dan basa, karena serat kasar mempunyai sifat kimia yang tidak larut dalam air, asam, atau basa meskipun dengan pemanasan atau hidrolisis. Penelitian ini juga dilakukan analisis kadar β -karoten dengan metode spektrofotometri, dan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Penelitian ini meliputi:

5.1 Inokulasi dan perhitungan Kultur Bakteri

Pada penelitian ini digunakan Inokulum kultur murni *Lactobacillus casei* FNCC 0090 yang diperoleh dari Pusat Antar Universitas (PAU) Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Menurut Kompiang (2009), bakteri *Lactobacillus casei* termasuk bakteri asam laktat yang telah diteliti dan mempunyai potensi untuk memperbaiki produk pangan. Beberapa penelitian menunjukkan aktivitas antimikroba yang dimiliki oleh BAL dan terbukti mampu menghambat pertumbuhan bakteri pathogen (Kusumawati, 2003)

Dari beberapa penelitian ditemukan bahwa bakteri *Lactobacillus casei* merupakan bakteri asam laktat yang baik dan berguna bagi kesehatan diantaranya adalah bakteri ini mampu memproduksi asam laktat yang dapat meningkatkan

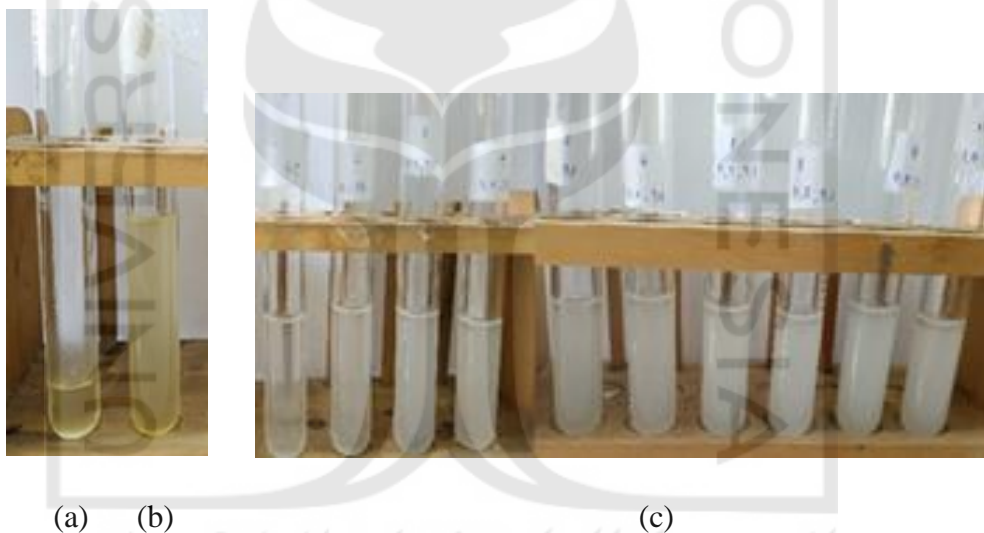
jumlah bakteri baik dan menurunkan bakteri jahat, mencegah gangguan pencernaan terutama diare, serta dapat mengaktifkan sel-sel kekebalan tubuh. Komposisi bakteri baik yang ada di dalam perut dapat melindungi tubuh dari diare, sembelit, meningkatkan kekebalan tubuh, dan menurunkan kolesterol. Spesies *Lactobacillus* mampu memecah protein, karbohidrat dan lemak dalam makanan, dan membantu penyerapan elemen penting dan nutrisi seperti mineral, asam amino, dan vitamin yang dibutuhkan manusia dan hewan untuk bertahan hidup (Damika,2006). *Lactobacillus casei* dapat diisolasi dari berbagai habitat seperti daging, susu, produk olahan susu, dan makanan atau minuman asam. Bakteri *Lactobacillus casei* secara luas digunakan sebagai kultur dalam proses produksi berbagai macam produk pangan.

Langkah awal yang dilakukan dalam penelitian ini adalah membuat media Broth steril untuk mengembangkan bakteri. Medium adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran zat-zat makanan yang diperlukan oleh bakteri untuk pertumbuhan. Sterilisasi media Broth dilakukan dengan metode panas basah. Metode ini dinamakan juga metode pemanasan dengan uap air dan tekanan. Pada sterilisasi metode ini digunakan alat yang dinamakan *autoclave*. Pada proses sterilisasi ini uap dipaparkan pada objek yang akan disterilisasi dengan tekanan 1 atm dan suhu 121 °C selama 2 Jam sehingga mengakibatkan matinya mikroorganisme.

Selanjutnya bakteri yang tumbuh di media Agar diinokulasikan ke media Broth dengan menggunakan jarum ose yang sudah disterilkan dengan bunsen, dengan cara ujung jarum dikenakan pada api bunsen hingga berpijar. Bakteri diambil 1 jarum ose kemudian ujung jarum dimasukkan pada media Broth dan tutup kembali tabung reaksi dengan rapat. Inokulasi bakteri dilakukan didalam *Laminar Air Flow (LAF)*. *LAF* merupakan alat yang mirip seperti lemari kaca dan berfungsi sebagai ruangan untuk isolasi suatu microba. *LAF* dilengkapi dengan blower untuk menyapu microba, dan Sinar UV untuk mensterilkan ruangan. Sterilisasi ruangan juga dilakukan dengan cara disemprot dengan Alkohol 70% kemudian dilap dengan tisu. Tabung reaksi yang sudah diinokulasi bakteri kemudian diinkubasi pada suhu 35 °C selama 24 jam. Suhu optimum untuk pertumbuhan *Lactobacillus casei* adalah

30-37 °C, namun pada suhu 15 °C *Lactobacillus casei* masih dapat tumbuh (Najgebauer *et al.*, 2011). Bakteri tumbuh ditandai dengan keadaan media yang awalnya kuning jernih menjadi kuning keruh.

Sebelum starter digunakan untuk fermentasi bahan, dilakukan perhitungan banyaknya bakteri menggunakan metode turbiditi dengan standar Mc Farland. Mc Farland adalah penyetaraan konsentrasi mikroba dengan menggunakan larutan BaCl₂ dan H₂SO₄. Standar Mc Farland merupakan suatu bentuk skala yang memiliki ukuran dari satu sampai sepuluh, skala ini menunjukkan konsentrasi bakteri per mili liter (Whitman and MacNair,2004). Standar Mc farland dapat digunakan untuk menentukan perkiraan konsentrasi sel pada suspensi atau larutan. Hasil perkiraan konsentrasinya dalam satuan CFU/mL. Larutan standar Mc Farland dapat dilihat pada **Gambar 9**.



Gambar 1. Larutan (a)= Media Broth, (b)=Bakteri, (c)=Deret larutan Standar Mc Farland

Standar Mc Farland secara umum berlabel 1-10 dan berisi larutan Barium Klorida 1,175% dan Asam Sulfat 1%. Dari masing-masing tabung yang terlihat pada **Gambar 6**. memiliki kekeruhan yang berbeda, sehingga dapat diperkirakan konsentrasi bakteri dengan mencocokkan kekeruhan bakteri dengan standar Mc Farland. Standar Mc Farland dapat dilihat pada **Tabel 6**.

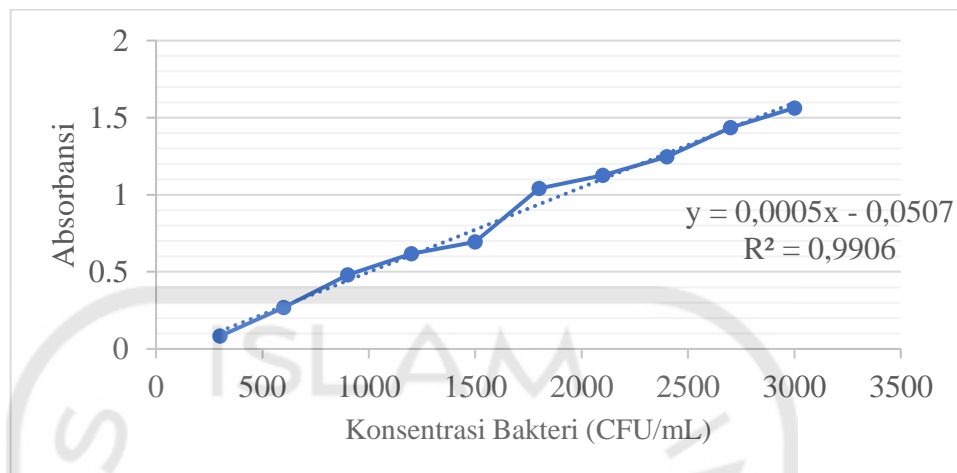
Tabel 1. Standar Mc Farland

No	Komposisi Bahan	Bakteri ($\times 10^6$ CFU/mL)
No. 1	0,1 mL Barium Klorida dalam 9,9 mL Asam Sulfat	300
No. 2	0,2 mL Barium Klorida dalam 9,8 mL Asam Sulfat	600
No. 3	0,3 mL Barium Klorida dalam 9,7 mL Asam Sulfat	900
No. 4	0,4 mL Barium Klorida dalam 9,6 mL Asam Sulfat	1200
No. 5	0,5 mL Barium Klorida dalam 9,5 mL Asam Sulfat	1500
No. 6	0,6 mL Barium Klorida dalam 9,4 mL Asam Sulfat	1800
No. 7	0,7 mL Barium Klorida dalam 9,3 mL Asam Sulfat	2100
No. 8	0,8 mL Barium Klorida dalam 9,2 mL Asam Sulfat	2400
No. 9	0,9 mL Barium Klorida dalam 9,1 mL Asam Sulfat	2700
No.10	1,0 mL Barium Klorida dalam 9,0 mL Asam Sulfat	3000

Sumber: Whitman dan MacNair, 2010

Keuntungan dari penggunaan standar Mc Farland adalah tidak dibutuhkan waktu inkubasi yang cukup untuk memperoleh jumlah kepadatan bakteri yang diinginkan. Sedangkan kerugiannya adalah, akan terjadi perbedaan pandangan dalam menilai tingkat kekeruhan dari sel bakteri jika dilihat hanya dengan visual. Sehingga untuk menilai kekeruhannya dapat digunakan spektrofotometer dengan Panjang gelombang 600 nm.

Dari pengujian yang dilakukan didapatkan hasil absorbansi dari deret standar, kemudian dibuat kurva regresi linear hubungan antara absorbansi (y) dengan konsentrasi bakteri/mL (x). Kurva standar Mc Farland dapat dilihat pada **Gambar 7.**



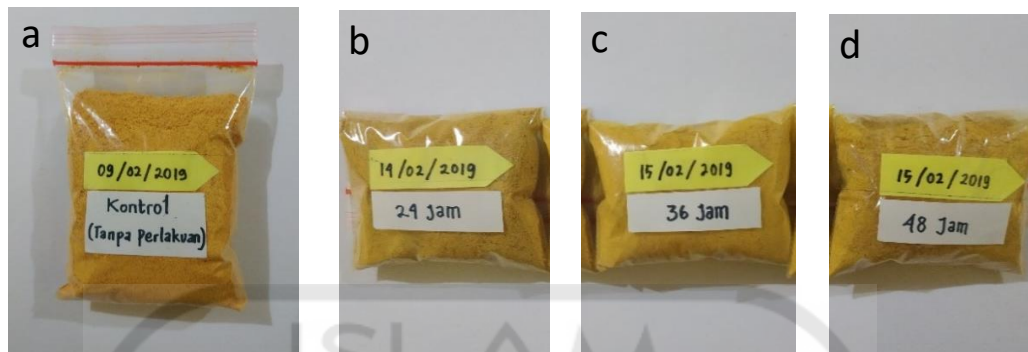
Gambar 2. Kurva Standar Mc Farland

Dari kurva standar tersebut dihasilkan persamaan regresi yaitu $Y=0,0005x-0,0507$ dan menunjukkan harga koefisien korelasi (R) sebesar 0,9906 (mendekati nilai 1) sehingga kurva tersebut dapat dikatakan linier dan dapat digunakan untuk menghitung konsentrasi sampel bakteri. Didapatkan hasil pengukuran absorbansi sampel bakteri sebesar 0,596. Hasil perhitungan jumlah koloni didapatkan sebesar $1293,4 \times 10^6$ CFU/mL.

5.2 Pembuatan Tepung labu kuning

Proses pembuatan Tepung labu kuning dimulai dengan mengupas kulit buah labu kuning (*Cucurbita moschata*), dan dibersihkan dari bijinya. Tepung dibuat dari daging buah labu kuning, karena, daging labu kuning kaya akan β -karoten yaitu 180 $\mu\text{g/g}$ sehingga memiliki potensi untuk dimanfaatkan sebagai sumber β -karoten alami (Murdijati *et al*, 2006). Daging labu kuning difermentasi dengan suspensi bakteri (*Lactobacillus casei*), dipastikan labu terendam sempurna oleh larutan bakteri *Lactobacillus casei*. Didalam 500 gram labu kuning terendam suspense bakteri sebanyak $1293,4 \times 10^6$ CFU/mL.

Setelah difermentasi selama 24 jam, 36 jam dan 48 jam, keringkan labu kuning dengan oven dengan suhu 50°C selama 20 jam. Setelah kering, labu dihaluskan dengan blender sampai menjadi tepung, diayak tepung yang masih kasar. Dibuat juga tepung tanpa perlakuan (kontrol) dengan cara yang sama tanpa perendaman bakteri. Didapatkan hasil tepung dari masing-masing variasi waktu fermentasi dapat dilihat pada **Gambar 8**.



Gambar 3. Tepung Labu Kuning, a=Tanpa Perlakuan, b=Fermentasi 24 Jam, c=Fermentasi 36 Jam, dan d=Fermentasi 48 Jam

Dapat dilihat pada **Gambar 8. a** bahwa tepung yang dihasilkan tanpa fermentasi lebih banyak dibandingkan **Gambar 8. b, c, dan d** yang sudah mengalami waktu fermentasi. Karena **Gambar 8. b, c, dan d** mengalami proses perendaman sehingga ada beberapa zat yang ikut larut karena tercuci dalam perendaman. Hasil tepung tanpa fermentasi lebih menggumpal dibanding tepung dengan perlakuan fermentasi karena kandungan gula yang tinggi dan suhu yang digunakan terlalu tinggi dalam pengeringan. Pengolahan labu kuning menjadi tepung merupakan suatu upaya pengawetan bahan pangan. Karena pada pembuatan tepung dari buah labu kuning terdapat proses pengeringan yaitu proses mengeluarkan atau menghilangkan sebagian air dari buah labu kuning, sehingga produk yang dihasilkan memiliki umur simpan yang lebih lama, mudah dalam pemanfatan, penyimpanan, dan pendistribusiannya.

Tepung labu kuning dianalisis nilai gizi dan kandungan β -karotennya yang dipercaya dapat berfungsi sebagai antioksidan. Analisis pangan merupakan salah satu bidang ilmu pangan yang berhubungan dengan cara-cara atau metode analitik dalam mendeteksi dan menetapkan komponen-komponen yang terdapat dalam bahan pangan baik segar maupun olahan. Analisis pangan menghasilkan data yang sangat dibutuhkan untuk mendukung suatu keputusan dalam menentukan mutu pangan ataupun tingkat keamanannya (Andarwulan, 2011).

Tepung labu kuning dengan variasi waktu fermentasi diukur pHnya, dengan cara diambil sejumlah sampel tepung labu kuning dan dilarutkan dengan aquades, kemudian dishaker dan diukur pHnya. Didapatkan nilai pH pada tepung labu

kuning tanpa perlakuan fermentasi sebesar 6,4, perlakuan fermentasi 24 jam sebesar 4,3, perlakuan fermentasi 36 jam sebesar 4,1, dan perlakuan fermentasi 48 jam sebesar 4,0. pH optimum yang dapat ditoleransi oleh *Lactobacillus casei* berada pada kisaran pH 3-5 (Broadbent dkk, 2010). *Lactobacillus casei* dapat aktif pada pH yang rendah dan menghasilkan asam laktat dalam jumlah yang lebih banyak dan memiliki kemurnian yang tinggi (90%-95%). Pengukuran pH tepung labu kuning dapat dilihat pada **Gambar 9**.



Gambar 4. Pengukuran pH pada Tepung Labu Kuning

Nilai pH yang didapatkan menunjukkan penurunan, seiring bertambahnya waktu fermentasi. Fermentasi dengan bakteri *Lactobacillus casei* akan merombak substrat berupa pati dan menghasilkan sejumlah besar asam laktat. Asam laktat yang dihasilkan akan menurunkan nilai pH dari lingkungan pertumbuhannya, jadi semakin asam pH yang didapat, maka asam laktat yang dihasilkan semakin tinggi. Hal ini diperkuat dari penelitian yang dilakukan oleh Muchtadi dan Ayustaningwarno (2010) yang mengatakan bahwa BAL adalah kelompok bakteri yang melakukan penguraian karbohidrat (glukosa) menjadi asam yang menurunkan pH serta menimbulkan rasa asam. Mekanisme fermentasi asam laktat pada labu kuning, yaitu glukosa pada labu kuning akan diubah menjadi asam piruvat melalui proses glikolisis. Asam piruvat kemudian diubah menjadi asam laktat karena terjadi proses transfer elektron dari NADH menjadi NAD^+ .

5.3 Penentuan Kadar Protein

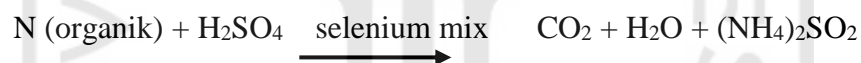
Pada penelitian ini dilakukan analisis kadar protein dengan metode Kjeldahl. Penetapan kadar protein dengan metode ini yaitu melalui penetapan kadar N dalam sampel yang disebut protein kasar, dengan asumsi adanya senyawa bernitrogen selain protein dapat diabaikan. Prinsip dari metode Kjeldahl adalah, senyawa-senyawa yang mengandung nitrogen, mengalami oksidasi dan dikonversi menjadi ammonia dan bereaksi dengan asam pekat membentuk ammonium sulfat. Kemudian ditambah basa untuk menetralisasi suasana reaksi kemudian didestilasi dengan asam dan dititrasi untuk mengetahui jumlah N yang dikonversi. Keuntungan menggunakan metode kjeldahl adalah dapat diaplikasikan untuk semua jenis bahan pangan, tidak memerlukan biaya yang mahal untuk pengerjaannya, dan merupakan metode yang umum untuk menentukan kandungan protein kasar.

Dalam penentuan kadar protein dengan metode Kjeldahl dibagi menjadi 3 tahap, yang pertama adalah destruksi, kedua adalah destilasi, dan yang terakhir adalah titrasi. Tahap awal dari penelitian ini adalah menimbang sampel tepung labu kuning dengan neraca analitik sebanyak 0,2 gram. Kemudian sampel dipanaskan dalam 3 mL asam sulfat sehingga terjadi destruksi menjadi unsur-unsurnya. Unsur C dan H, habis menjadi CO_2 dan H_2O sedangkan unsur N akan tereduksi menjadi garam $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dalam larutan asam sulfat. Untuk mempercepat proses destruksi ditambahkan katalis selenium. Dengan penambahan katalis selenium mix tersebut titik didih asam sulfat akan dipertinggi, sehingga destruksi berjalan lebih cepat. Proses destruksi dapat dilihat pada **Gambar 10**.



Gambar 5. Proses Destruksi Sampel Tepung

Pada saat proses destruksi timbul gas CO_2 dan H_2O , warna larutan sampel hitam kental, ditunggu hingga gas hilang dan sampel berubah menjadi warna kuning jernih. Reaksi yang terjadi pada saat proses destruksi adalah:

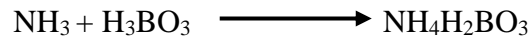


Tahap kedua yaitu Destilasi, sampel hasil destruksi diencerkan menggunakan labu ukur 50 mL dengan aquades, dan ditambahkan NaOH, kemudian di destilasi. Pada tahap destilasi ammonium sulfat dipecah menjadi ammonia (NH_3) dengan penambahan NaOH sampai alkalis dipanaskan. Reaksi yang terjadi saat destilasi:

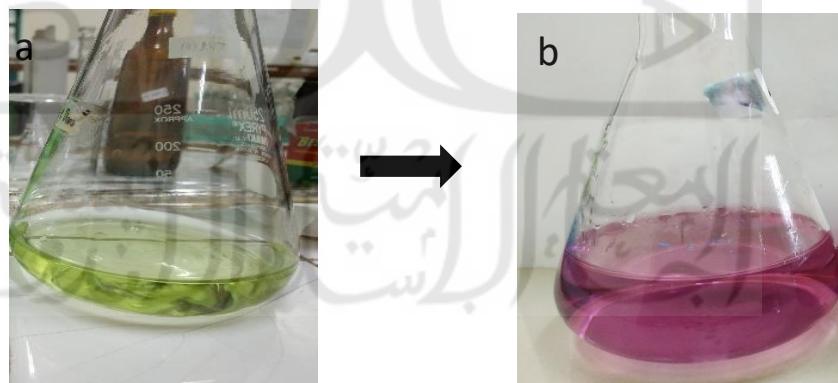


Selanjutnya disiapkan penampang yang berisi Asam Borat 3% sebanyak 10 mL dan ditambah 3 tetes indikator yang dibuat dari metil merah dan metil biru untuk mengetahui asam dalam keadaan berlebih. Warna larutan pada penampang destilat setelah ditambah indikator metil merah dan metil biru menghasilkan warna ungu. Agar saat destilasi tidak terjadi *superheating* ditambahkan batu didih pada labu alas bulat yang berisi sampel. Amonia yang dibebaskan selanjutnya akan ditangkap oleh larutan asam yang dipakai dalam jumlah berlebih. Ujung tabung destilasi tercelup

sedalam mungkin dalam asam agar kontak antara ammonia dan asam lebih baik. Destilat yang dihasilkan berwarna hijau. Reaksi yang terjadi pada penampung H_3BO_3 :

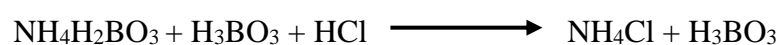


Tahap terakhir adalah titrasi. Titrasi pada penelitian ini menggunakan metode titrasi tidak langsung. Jika digunakan larutan asam kuat standar, maka titrasi yang dilakukan disebut titrasi kembali sedangkan jika dipakai larutan asam borat maka disebut titrasi tidak langsung. Pada metode titrasi tidak langsung, ammonia bereaksi dengan asam borat menghasilkan garam asam borat yang bersifat netral. Garam tersebut dapat dititrasi dengan larutan asam standar. Pada penelitian ini digunakan HCl 1 N Jumlah larutan asam yang dibutuhkan adalah proporsional dengan jumlah ammonia yang bereaksi dengan asam borat. Titrasi pada penelitian ini disebut titrasi tidak langsung karena ammonia ditentukan, bukan dititrasi. Ammonia ditentukan secara tidak langsung dengan titrasi dari garam asam borat. Sedangkan pada titrasi langsung, analit akan langsung bereaksi dengan pentiter. Pada penelitian ini digunakan indikator metil merah, akhir titrasi ditandai dengan tepat perubahan warna larutan menjadi merah muda dan tidak hilang selama 30 detik. Perubahan warna larutan dapat dilihat pada **Gambar 11**.



Gambar 6. Larutan Sampel, a=Sebelum Titrasi, b=Setelah Titrasi

Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut:



Kadar protein dalam sampel dapat ditentukan dengan rumus $\%N = \frac{\text{ml HCl (sampel-blanko)}}{\text{berat sampel (g)}} \times 1000 \times \text{NHCl} \times 14,008 \times 100\%$. Setelah diperoleh %N, selanjutnya dihitung kadar protein dengan mengalikan suatu faktor. Faktor perkalian N menjadi protein tergantung pada presentase N yang menyusun protein dalam suatu bahan (Sudarmadji, 1989). Faktor konversi untuk protein secara umum adalah 6,25, susu dan hasil olahannya: 6,38, mentega, kacang: 5,46 (SNI 01-2891-1992).

Hasil data analisis kadar protein dalam tepung labu kuning dapat dilihat pada **Tabel 7**.

Tabel 2. Kadar Protein Tepung Labu Kuning (*Cucurbita moschata*)

No.	Sampel	Kadar Protein
1	Tanpa Perlakuan	6,78 %
2	Fermentasi 24 Jam	7,66 %
3	Fermentasi 36 Jam	9,18 %
4	Fermentasi 48 Jam	11,59 %

Dari hasil analisis kadar protein pada labu kuning (*Cucurbita moschata*) dengan variasi waktu fermentasi menghasilkan data kenaikan kadar protein seiring lamanya waktu fermentasi. Pada penelitian ini hanya menggunakan waktu fermentasi hitungan jam, namun dapat menghasilkan protein yang cenderung meningkat. Sedangkan pada penelitian yang telah dilakukan oleh Wuniarto dkk, (2014) didapatkan hasil protein pada fermentasi tepung sagu dengan *Rhizopus sp.* secara anaerob selama 10 hari hanya dapat meningkatkan kadar protein dari 1,11% menjadi 5,70%.

Semakin lama waktu fermentasi, kadar protein dalam labu kuning semakin meningkat, karena saat proses fermentasi *Lactobacillus casei* akan merombak substrat berupa pati dan menghasilkan sejumlah besar asam laktat. Dengan kondisi demikian, protein yang terlarut terhidrolisis menjadi asam amino sehingga kadar protein terlarut dalam sampel meningkat. Selain itu peningkatan jumlah protein pada sampel disebabkan karena adanya jumlah biomassa *Lactobacillus casei* yang semakin tinggi, dimana sebagian besar selnya merupakan protein

5.4 Penentuan Kadar Karbohidrat

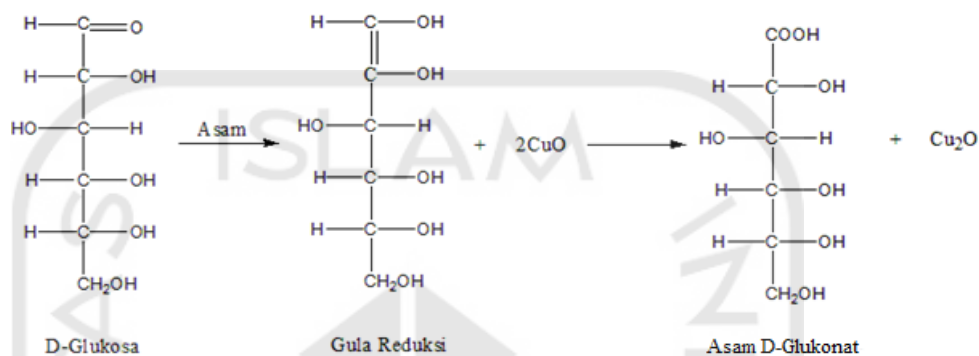
Menurut Rohmaningsih, (2008) Gula reduksi adalah monosakarida dan beberapa disakarida mempunyai sifat dapat mereduksi, terutama dalam suasana basa. Sifat sebagai reduktor ini dapat digunakan untuk keperluan identifikasi karbohidrat maupun analisis kuantitatif. Berdasarkan hal tersebutlah bahan pangan dapat diidentifikasi kandungan karbohidratnya. Karbohidrat berperan penting dalam menentukan karakteristik bahan makanan, warna, rasa, dan tekstur.

Jenis karbohidrat yang terdapat banyak pada tumbuhan adalah monosakarida, yaitu fruktosa dan glukosa serta disakarida yaitu sukrosa, maltosa, dan selobiosa. Monosakarida menyebabkan buah-buahan terasa manis dan larut dalam air (Dwidjoseputro 1992). Amilum adalah jenis polisakarida yang merupakan bentuk simpanan pada sel-sel tumbuhan termasuk dalam buah-buahan, sedangkan pektin merupakan polisakarida lain dan berperan dalam proses pelunakan buah yang sudah matang (Fitriningrum *et al.* 2013).

Pada penentuan kadar karbohidrat dilakukan menggunakan metode Nelson-Somogyi. Reagen kupri-sulfat kadar rendah (Nelson) akan direduksi oleh gula reduksi menghasilkan kupro-oksida yang selanjutnya direaksikan dengan reagen arsenomolibdat membentuk senyawa kompleks warna ungu yang dapat diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Semakin tinggi kandungan gula reduksi larutan yang dianalisis, maka semakin kuat warna ungu yang terbentuk, maka semakin besar nilai absorbansinya.

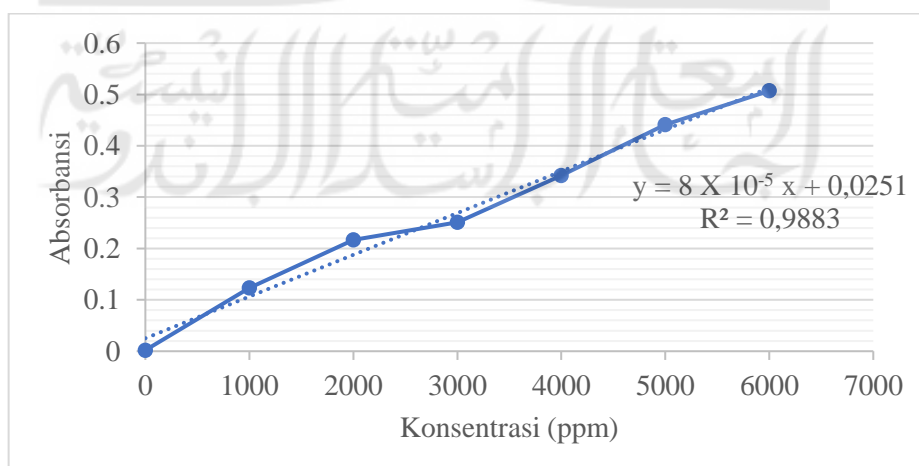
Dalam penentuan gula reduksi yang pertama dilakukan adalah membuat reagen Nelson-Somogyi dengan komposisi Nelson A: Nelson B (25:1) dan larutan standar. Masing-masing konsentrasi tersebut diambil sebanyak 1 mL dimasukkan kedalam masing-masing tabung reaksi dan ditambahkan Reagen nelson yang sudah dibuat. Kemudian dipanaskan dengan penangas selama 30 menit. Setelah proses pemanasan, larutan standar berubah menjadi merah, dan larutan sampel berubah menjadi orange. Setelah proses pemanasan selesai, diinginkan larutan dan ditambahkan 1 mL arsenomolibdat. Metode Nelson-Somogyi didasarkan pada reduksi ion Cu^{2+} menjadi ion Cu^{+} dengan adanya gula reduksi. Ion Cu^{+} selanjutnya mereduksi kompleks arsenomolibdat. Komposisi arsenomolibdat terdiri dari

ammonium molibdat dan natrium arsenat dalam asam sulfat. Reduksi kompleks arsenomolibdat menghasilkan zat warna biru yang intens dan stabil yang dapat diukur dengan metode Spektrofotometri (Rohman, 2013). Mekanisme reaksi pada analisis gula reduksi dapat dilihat pada **Gambar 12**.



Gambar 7. Mekanisme Reaksi Analisis Gula Reduksi

Penentuan gula reduksi dengan metode Nelson-Somogyi didasarkan pada absorbansi dengan panjang gelombang 500 nm yang berupa kompleks berwarna yang terbentuk antara gula teroksidasi tembaga dan arsenomolibdat. Banyaknya karbohidrat yang terdapat pada sampel ditentukan dengan kurva baku menggunakan standar gula reduksi. Diukur absorbansi masing-masing baik standar maupun sampel. Pengukuran sampel dilakukan sebanyak 2 kali. Didapatkan kurva standar glukosa dengan konsentrasi sebagai (x) dan absorbansi sebagai (y). Berikut Kurva Standar yang dihasilkan, dapat dilihat pada **Gambar 13**.



Gambar 8. Kurva Standar Glukosa

Didapatkan persamaan linier dan didapatkan sebesar $y = 8 \times 10^{-5} + 0,0251$ dan didapatkan harga koefisien korelasi (R) sebesar 0,9883.

Selanjutnya dilakukan preparasi sampel. Perlakuan sampel dan standar sama, kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 500 nm. Kadar karbohidrat dihitung dari nilai absorbansi yang didapat dari masing-masing sampel yang dimasukkan dalam persamaan regresi yang dihasilkan dari standar glukosa. Didapatkan hasil analisis kadar karbohidrat dapat dilihat pada **Tabel 9**.

Tabel 3. Kadar Karbohidrat Tepung Labu Kuning (*Cucurbita moschata*)

Sampel	Kadar Karbohidrat (%)
Tanpa Perlakuan	56,36
Fermentasi 24 Jam	42,11
Fermentasi 36 Jam	38,92
Fermentasi 48 Jam	37,50

Dapat dilihat pada **Tabel 8**, bahwa waktu fermentasi pada proses pembuatan labu kuning berpengaruh pada kadar karbohidrat. Dari hasil yang didapat Fermentasi dengan *Lactobacillus casei* dengan waktu 48 jam dapat menurunkan kadar karbohidrat sebesar 18,86%. Sedangkan pada penelitian yang telah dilakukan oleh Caesy *et al*, (2018) didapatkan hasil fermentasi selama 10 hari hanya turun sebesar 8,35%. Semakin lama waktu fermentasi, maka kadar karbohidrat semakin menurun, karena didalam BAL memproduksi enzim beta-glukosidase untuk memecah ikatan antara 2 molekul karbohidrat atau ikatan antara karbohidrat dan molekul non karbohidrat. Pertumbuhan bakteri asam laktat memerlukan adanya glukosa untuk memulai pertumbuhan. Glukosa merupakan inhibitor dari enzim beta-glukosidase yang berperan dalam memecah karbohidrat, sehingga semakin rendah glukosa maka aktivitas enzim beta-glukosidase semakin tinggi, sehingga semakin lama fermentasi kadar karbohidrat semakin menurun.

5.5 Penentuan Kadar Serat Kasar

Analisis serat kasar bertujuan untuk mengetahui nilai awal sebelum dan sesudah dilakukan proses fermentasi oleh bakteri. Serat merupakan bentuk dari karbohidrat yang tidak dapat dicerna dalam usus halus manusia serta mengalami fermentasi sebagian atau keseluruhan di usus besar. Salah satu fungsi serat adalah

membantu penyerapan glukosa sehingga glukosa yang masuk ke sel-sel darah akan melambat dan menjaga kadar gula darah yang normal.

Pada penelitian ini dilakukan analisis serat kasar. Serat kasar adalah bagian dari pangan yang tidak dapat dihidrolisis oleh bahan-bahan kimia yang digunakan untuk menentukan kadar serat kasar, sedangkan serat pangan adalah bagian dari bahan pangan yang tidak dapat dihidrolisis oleh enzim-enzim pencernaan. Oleh karena itu kadar serat kasar nilainya lebih rendah dibanding serat pangan karena asam kuat dan basa kuat mempunyai kemampuan yang lebih besar untuk menghidrolisis komponen pangan dibandingkan dengan enzim-enzim pencernaan (Muchtadi,2001)

Analisis kadar serat kasar dilakukan penghilangan lemak dengan pelarut n-heksan Selanjutnya ditimbang sebanyak 1 gram dan ditambah dengan H_2SO_4 1,25 % dan NaOH 3,05 % pada proses refluks. Proses refluks dapat dilihat pada **Gambar 14**.



Gambar 9. Proses Refluks

Tujuan ditambah H_2SO_4 dan NaOH, karena serat kasar tidak dapat dihidrolisis asam kuat dan basa lemah sehingga nantinya yang terukur hanya serat kasar dan komponen pangan lainnya dapat terhidrolisis. Refluks dilakukan untuk mempercepat reaksi sekaligus mengekstraksi sampel dengan pelarut pada temperature didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut yang konstan. Hasil

refluks disaring dalam keadaan panas dengan corong *buchner* dan kertas saring yang sudah ditimbang sebelumnya. Penyaringan harus dilakukan segera karena jika terlalu lama dibiarkan hasil analisis lebih rendah karena perusakan serat akan terjadi lebih lanjut oleh bahan kimia yang digunakan.

Residu yang didapat saat penyaringan, dibilas dengan H₂SO₄ 1,25 % panas, aquades panas, dan etanol 96 % secara berurutan. Penggunaan aquades untuk membilas residu adalah untuk melarutkan komponen lain selain serat kasar sisa dari komponen yang tidak terhidrolisis. Aquades yang digunakan harus dalam keadaan panas untuk mencegah penggumpalan pada residu. Tujuan penggunaan larutan H₂SO₄ 1,25 % dan etanol 96 % adalah untuk membantu penghilangan lemak pada sampel. Pemberian larutan harus dilakukan secara berurutan, karena jika tidak berurutan maka residu pada kertas saring akan menggumpal sehingga hasil yang didapatkan kurang akurat. Hasil residu pada kertas saring dapat dilihat pada **Gambar 15**.



Gambar 10. Sampel Kering

Hasil residu pada kertas saring dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 105°C, tujuannya adalah menghilangkan sisa-sisa komponen selain serat kasar (contohnya air). Kemudian didinginkan didalam desikator. Sampel kering harus dibiarkan terlebih dahulu agar berat yang didapat konstan. Didapatkan hasil analisis serat dapat dilihat pada **Tabel 9**.

Tabel 4. Kadar Serat Kasar Tepung Labu Kuning (*Cucurbita moschata*)

Waktu Fermentasi	% Serat Kasar
0 Jam	14,13
24 Jam	12,64
36 Jam	11,85
48 Jam	10,43

Dari hasil analisis dapat disimpulkan bahwa waktu fermentasi berpengaruh pada kadar serat kasar. Hasil yang didapatkan sesuai hipotesa bahwa fermentasi akan menurunkan kadar serat dan didapatkan hasil kadar serat kasar sebelum fermentasi sebesar 14,13% dan pada waktu fermentasi 48 jam sebesar 10,43%. Fermentasi dengan *Lactobacillus casei* dengan waktu 48 jam dapat menurunkan kadar serat sebesar 3,7%. Sedangkan penelitian yang telah dilakukan oleh Caesy *et al.*, (2018) fermentasi dengan *Aspergillus Niger* pada tepung sagu secara aerob selama 10 hari hanya dapat menurunkan kadar serat kasar sebesar 4,02%. Penurunan serat kasar dapat terjadi karena perombakan serat kasar kompleks pada labu kuning oleh enzim yang dihasilkan *Lactobacillus casei* menjadi senyawa yang lebih sederhana dan mudah dicerna. Hal tersebut didukung dengan pernyataan Kurniati *et al.*, (2012), bahwa *Lactobacillus casei* merupakan BAL yang mensekresikan enzim selulase untuk mengkonversi selulosa menjadi glukosa.

5.6 Penentuan Kandungan β -karoten

Pada penelitian ini dilakukan analisis kuantitatif kandungan β -karoten pada buah labu kuning (*Cucurbita moschata*) secara Spektrofotometer UV-Vis, dengan Panjang gelombang 451 nm. Penelitian yang dilakukan oleh Chandra dkk, (2017) didapatkan hasil spektrum panjang gelombang maksimum β -karoten pada panjang gelombang 451 nm. Pada penelitian yang dilakukan oleh Majid, (2010) menyatakan bahwa bila suatu puncak senyawa organik menunjukkan 3 puncak yang jelas pada daerah tampak 400-500 nm dengan sedikit serapan didaerah lain, maka dapat dinyatakan senyawa tersebut merupakan senyawa karoten Karoten total dapat ditentukan secara spektrofotometri UV-Vis dan pengukuran hanya dilakukan pada satu Panjang gelombang maksimum β -karoten. Fennema (1996) juga menjelaskan

bahwa pada panjang gelombang antara 430-480 nm diperkirakan terjadinya deteksi panjang gelombang karoten.

Pada penelitian ini sampel tepung labu kuning dimaserasi selama 72 jam. Maserasi merupakan proses perendaman sampel menggunakan pelarut organik pada temperatur ruang. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dengan perendaman sampel akan terjadi pemecahan dinding dan membrane sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel, sehingga metabolit sekunder yang ada di dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan. Proses maserasi dapat dilihat pada **Gambar 16**.

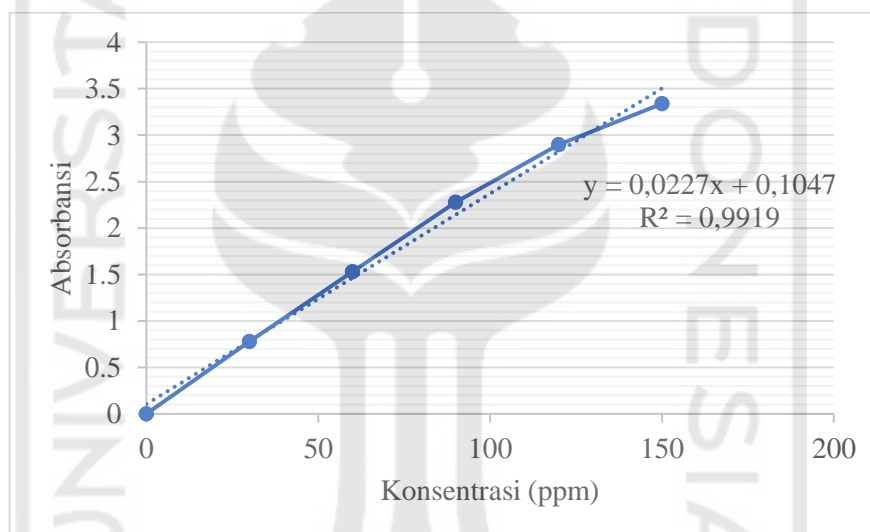


Gambar 11. Proses Maserasi Tepung Labu Kuning

Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut. Dalam penelitian ini maserasi dilakukan menggunakan pelarut kloroform, karena baik β -karoten maupun kloroform memiliki kepolaran yang sama yaitu bersifat non polar sehingga kloroform mampu melarutkan β -karoten sesuai dengan prinsip *like dissolve like*. Allinger, (1976) menyatakan bahwa β -karoten merupakan kristal berwarna merah, larut dalam karbon disulfida, benzene, kloroform, eter, petroleum eter, dan tidak larut dalam air, asam, dan basa.

Masing-masing sampel yang telah dimaserasi kemudian disaring untuk mendapatkan filtrat sampel. Dibuat deret standar β -karoten Baik standar maupun sampel diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 451 nm. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Chandra, (2017) didapatkan hasil adanya tiga puncak spektrum dan spektrum tertinggi yaitu pada panjang gelombang 451,00 nm.

Dari pengujian yang dilakukan didapatkan hasil absorbansi standar. Dari absorbansi tersebut dibuat kurva standar hubungan antara konsentrasi (x) dengan absorbansi (y). Berikut kurva yang dihasilkan dari konsentrasi Vs absorbansi dari standar β -karoten:



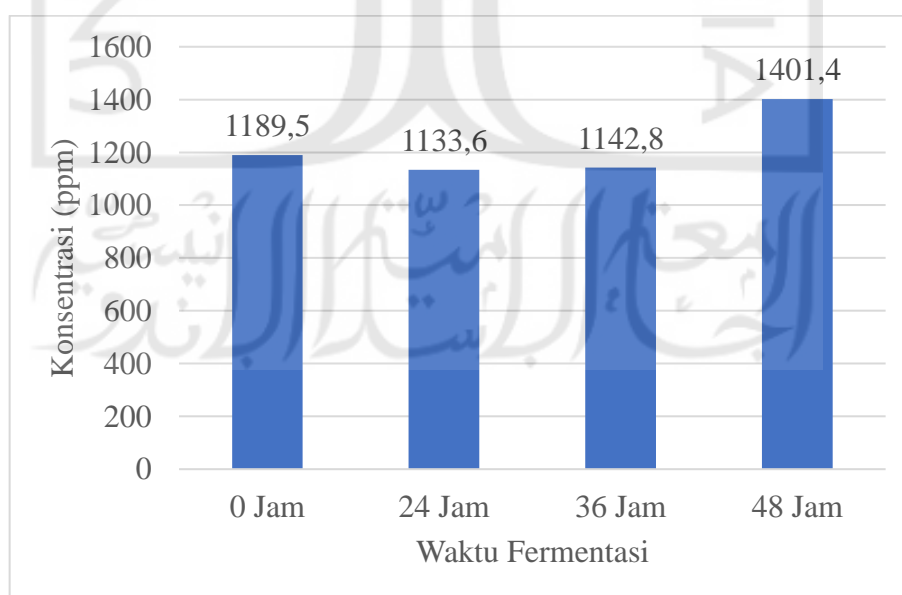
Gambar 12. Kurva Standar β -karoten

Didapatkan persamaan regresi yaitu $Y=0,0227x + 0,1047$ dan menunjukkan harga koefisien korelasi (R) sebesar 0,9919. Ekstrak sampel dari variasi waktu fermentasi masing-masing diukur absorbansinya. Dari hasil absorbansi sampel dapat dihitung konsentrasi masing-masing sampel dengan memasukkan nilai absorbansi pada persamaan regresi. Berikut hasil analisis kadar β -karoten pada tepung labu kuning dapat dilihat pada **Tabel 10**.

Tabel 5. Kadar β -karoten Sampel Tepung Labu Kuning (*Cucurbita moschata*)

Fermentasi	Konsentrasi (ppm)
0 Jam	1189,5
24 Jam	1133,6
36 Jam	1142,8
48 Jam	1401,4

Didapatkan hasil konsentrasi β -karoten terendah adalah pada waktu fermentasi 24 jam dengan konsentrasi 1133,6 ppm dan konsentrasi β -karoten tertinggi pada waktu fermentasi 48 jam yaitu 1401,4 ppm. Dari konsentrasi 24 jam, 36 jam, dan 48 jam menghasilkan data yang linear. Kandungan β -karoten tepung fermentasi lebih tinggi disebabkan karena asam-asam organik yang dihasilkan selama proses fermentasi dapat menurunkan pH sehingga mampu mengurangi reaksi oksidasi β -karoten dan kehilangan β -karoten selama pengolahan dapat diminimalisir. Fermentasi 24 jam mengalami penurunan disebabkan karena oksidasi yang disebabkan karena adanya oksigen dan cahaya. Menurut Pratama, (2010) kadar β -karoten dapat mengalami penurunan akibat ketidakstabilannya terhadap suhu yang tinggi. Hasil analisa β -karoten setelah fermentasi dapat dilihat pada **Gambar 18**.

**Gambar 13.** Diagram Batang Pengaruh Fermentasi Terhadap Kadar β -karoten

Dapat disimpulkan bahwa perlakuan lama fermentasi selama 48 jam merupakan perlakuan terbaik untuk menghasilkan kadar β -karoten yang tinggi pada tepung labu kuning. Semakin lama waktu fermentasi berpengaruh pada banyaknya bakteri asam laktat yang menghasilkan β -karoten, semakin banyak bakteri asam laktat, semakin banyak pula kadar β -karoten yang dihasilkan. Penelitian yang dilakukan oleh Barbosa *et al*, (2008) menunjukkan bahwa karoten yang terkandung dalam labu kuning jenis *Cucurbita moschata* adalah jenis β -karoten. Karoten berfungsi sebagai antioksidan, sedangkan β -karoten merupakan salah satu bentuk senyawa karoten sebagai penawar yang kuat untuk oksigen reaktif.

5.7 Penentuan Aktivitas Antioksidan

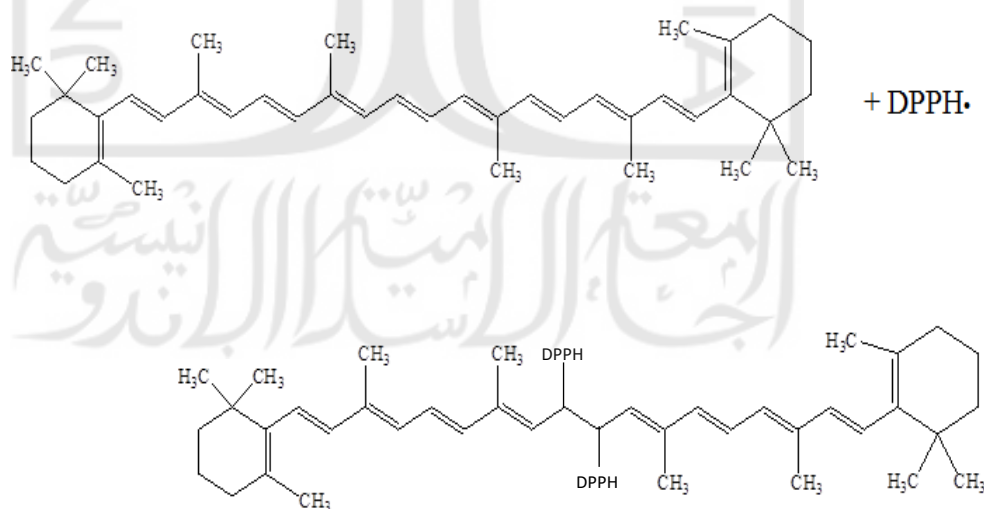
Salah satu uji untuk menentukan aktivitas antioksidan penangkap radikal adalah metode DPPH. Dipilih metode DPPH karena sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel. Metode DPPH dapat digunakan untuk sampel yang berbentuk padatan maupun cairan (Prakash, Rigelhof, dan Miller, 2010). DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan sering digunakan untuk uji aktivitas antioksidan beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam (Molyneux, 2003).

Pada metode ini DPPH berperan sebagai radikal bebas yang diredam oleh antioksidan dari bahan uji, dimana DPPH akan bereaksi dengan antioksidan. Reaksi ini menyebabkan terjadinya perubahan warna dari ungu menjadi kuning yang dapat diukur dengan spektrofotometer sinar tampak pada panjang gelombang maksimum 517 nm, sehingga aktivitas peredaman radikal bebas oleh sampel dapat ditentukan (Juniarti dan Yuhernita, 2009). Perubahan warna terjadi karena elektron ganjil dari radikal DPPH telah berpasangan dengan hydrogen dari senyawa penangkap radikal bebas.

Dari hasil pengujian kadar β -karoten tertinggi adalah pada waktu fermentasi 48 jam, dan pada waktu fermentasi 0 jam (tanpa perlakuan). Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan pada sampel tanpa perlakuan dan kadar tertinggi β -karoten setelah proses fermentasi. Pengujian aktivitas antioksidan pada penelitian ini dilakukan dengan cara disiapkan masing-masing sampel yang telah difermentasi

dengan variasi waktu 0 jam, dan 48 jam. Kemudian masing-masing sampel dimaserasi dengan kloroform. Ekstrak kloroform memiliki aktivitas antioksidan yang baik karena ekstrak kloroform mengandung senyawa yang memiliki kemampuan meredam radikal bebas. Ekstrak sampel yang dihasilkan, kemudian dibuat variasi konsentrasi 1%, 3%, dan 5%.

Masing-masing variasi konsentrasi diambil sebanyak 2 mL kemudian ditambah dengan larutan DPPH dengan konsentrasi 25 ppm. Sebelum ditambahkan larutan DPPH, sampel memiliki warna kuning jernih, dan setelah ditambahkan dengan larutan DPPH warna larutan menjadi ungu violet. Dibuat juga larutan kontrol DPPH. Masing-masing sampel diinkubasi pada suhu 27°C dalam keadaan gelap selama 30 menit. Inkubasi dilakukan untuk mengoptimalkan aktivitas DPPH agar terjadi reaksi antara DPPH dengan sampel yang diuji (Hatano *et al*, 1988). Setelah diinkubasi selama 30 menit, warna DPPH akan berubah dari ungu menjadi kuning (*diphenyl picrylhydrazin*) seiring penambahan antioksidan yaitu saat elektron tunggal pada DPPH berpasangan dengan hidrogen dari antioksidan. Senyawa antioksidan yang berperan dalam penelitian ini adalah senyawa β -karoten. Reaksi penangkapan hidrogen dari senyawa β -karoten oleh DPPH dapat dilihat pada **Gambar 19**.



Gambar 14. Reaksi Penangkapan Hidrogen Oleh DPPH dari Zat Antioksidan (Sharma dkk, 2010)

Perubahan absorbansi akibat reaksi ini telah digunakan secara luas untuk menguji kemampuan beberapa molekul sebagai penangkap radikal bebas. Setelah sampel di inkubasi, kemudian dilakukan pengukuran serapan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum 517 nm. Semakin besar konsentrasi sampel maka semakin banyak elektron yang didonorkan untuk meredam radikal bebas dalam hal ini DPPH, sehingga serapan yang diberikan pun semakin menurun tergantung dengan jumlah elektron yang diambil (Dehpour *et al*, 2009).

Didapatkan hasil persamaan regresi pada sampel ekstrak tepung labu kuning pada waktu fermentasi 0 jam dan 48 jam, yang didapatkan dari hasil plot antara % inhibisi dengan variasi konsentrasi. Didapatkan harga koefisien korelasi (R) tanpa fermentasi sebesar 0,9434, dan pada fermentasi 48 jam sebesar 0,996.

Hasil perhitungan persen inhibisi diplot dengan konsentrasi sampel pada sumbu x dan y pada persamaan regresi linier. Didapatkan persamaan regresi linier dalam bentuk $y=ax+b$, kemudian digunakan untuk mencari nilai IC_{50} dari masing-masing sampel dengan menyatakan nilai y sebesar 50 dan nilai x diperoleh sebagai IC_{50} . Hasil % inhibisi dan IC_{50} pada masing-masing ekstrak sampel dapat dilihat pada **Tabel 11**.

Tabel 6. Nilai IC_{50} sampel ekstrak Tepung Labu Kuning

Sampel	Konsentrasi	% Inhibisi	Persamaan Regresi	Y	IC_{50}
0 Jam (TP)	1 %	30,51	Y=333,33x + 26,229 R=0,9434	50	0,07
	3 %	34,34			
	5 %	43,84			
48 Jam	1 %	23,03	Y=828,28x + 14,141 R=0,996	50	0,04
	3 %	37,78			
	5 %	56,16			

Dalam metode DPPH terdapat parameter IC_{50} (*Inhibition Concentration 50* %). Parameter IC_{50} menunjukkan konsentrasi ekstrak uji yang mampu menangkap radikal bebas sebanyak 50%. Nilai IC_{50} dihitung berdasarkan presentase inhibisi terhadap radikal DPPH dari masing-masing konsentrasi larutan sampel. Harga IC_{50} berbanding terbalik dengan kemampuan zat atau senyawa yang bersifat sebagai antioksidan. Semakin kecil IC_{50} suatu senyawa uji maka senyawa tersebut semakin

efektif sebagai penangkal radikal bebas (Rohman dkk., 2005). Hasil uji kadar β -karoten dengan IC_{50} dapat dilihat pada **Tabel 12**.

Tabel 7. Hasil Uji Kadar β -karoten dan Nilai IC_{50} Pada Ekstrak Sampel Tepung

Sampel	Kadar β -karoten (ppm)	IC_{50}
Tanpa Perlakuan (0 Jam)	1189,5	0,07
Fermentasi 48 Jam	1401,4	0,04

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi β -karoten yang lebih tinggi pada sampel uji menunjukkan semakin besarnya aktivitas antioksidan. Aktivitas antioksidan pada ekstrak sampel 0 jam dengan kadar β -karoten 1189,5 ppm memiliki nilai IC_{50} sebesar 0,07 dan pada 48 jam sebesar 1401,4 ppm memiliki nilai IC_{50} sebesar 0,04. Penelitian yang sudah dilakukan oleh Soedarto, (2006) menunjukkan aktivitas antioksidan lebih tinggi pada tepung labu kuning dibandingkan dengan tepung mocaf yang ditunjukkan pada **Tabel 13**.

Tabel 8. Hasil Analisis Aktivitas Antioksidan Tepung Labu Kuning dan Mocaf

Tepung	Aktivitas Antioksidan (%)
Labu Kuning	66,73
Mocaf	29,42

Hal ini didukung oleh Esvandary yang menyatakan bahwa β -karoten mampu menangkap oksigen reaktif dan radikal peroksil lalu menetralkannya. Radikal bebas adalah sekelompok bahan kimia baik berupa atom maupun molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan pada lapisan luarnya atau kehilangan elektron. Dapat dikatakan, radikal bebas bersifat tidak stabil dan selalu berusaha mengambil elektron dari molekul di sekitarnya, sehingga radikal bebas bersifat toksik terhadap molekul biologi/sel. Radikal bebas dapat mengganggu produksi DNA, lapisan lipid pada dinding sel, mempengaruhi pembuluh darah, dan protein lain seperti enzim yang terdapat dalam tubuh.

Menurut Armala (2009) dalam Putra (2012) menyatakan tingkat kekuatan antioksidan senyawa uji menggunakan metode DPPH dapat digolongkan menurut nilai IC_{50} , seperti yang ditunjukkan pada **Tabel 14**.

Tabel 9. Tingkat Kekuatan Antioksidan Dengan Metode DPPH

Intensitas	Nilai IC ₅₀
Sangat Kuat	< 50
Kuat	50-100
Sedang	100-150
Lemah	>150

Sumber: Putra, 2012

Dari **Tabel 14.** tersebut dapat dikatakan bahwa aktivitas antioksidan pada sampel tanpa perlakuan dan fermentasi 48 jam pada proses pembuatan tepung labu kuning memiliki intensitas yang sangat kuat karena nilai IC₅₀ yang kecil yaitu kurang dari 50 mg/L.

